

# Inflammatory markers in peripheral arterial disease patients after endovascular revascularization with new restenosis

Parametry stanu zapalnego u chorych na miażdżycę tętnic kończyn dolnych po obwodowej, wewnątrznaczyniowej rewaskularyzacji i po powstaniu restenozy

Daniel Kotschy, Maria Kotschy, Leszek Masłowski, Paweł Socha, Justyna Kwapisz, Agnieszka Czyżewska-Buczyńska, Maciej Karczewski, Wojciech Witkiewicz

Wojewódzki Szpital Specjalistyczny, Ośrodek Badawczo-Rozwojowy we Wrocławiu, Projekt WroVasc — Zintegrowane Centrum Medycyny Sercowo-Naczyniowej (Regional Specialized Hospital, Research and Development Centre in Wrocław, Project WroVasc — Integrated Centre of Cardiovascular Medicine, Poland)

## Abstract

**Introduction.** Inflammation plays a central role in the pathophysiology and progression of atherosclerosis, also in patients with peripheral arterial disease (PAD). Revascularization is a risk factor which intensifies this process sometimes leading to newly developed restenosis.

**Aim.** To determine the levels of fibrinogen, C-reactive protein (CRP), interleukin 6 (IL-6), interleukin 10 (IL-10), basic fibroblast growth factor (bFGF) and transforming growth factor-beta 1 (TGF- $\beta$ 1) in the blood of patients with PAD after endovascular revascularization of lower limbs and in patients with new restenosis.

**Material and methods.** The study included 150 patients with PAD (90 men and 60 women), aged 50–88 (mean 65.5) years after successful peripheral angioplasty (PTA) and/or stenting. Within 12 months after revascularization procedure in 38 PAD patients restenosis occurred. Control group for cytokines consisted of 15 clinically healthy subjects without limb ischaemia aged 60–83 years. Fasting blood was drawn in the morning and put into 3.2% sodium citrate in a 9:1 proportion (for determination of fibrinogen and CRP), and 2.6 ml of blood was mixed with EDTA for determination of cytokines: IL-6, IL-10, bFGF and TGF- $\beta$ 1. All parameters were measured in the plasma of patients with commercial kits for enzyme immunoassay; fibrinogen and CRP levels were measured with coagulometer.

**Results.** In the plasma of patients with PAD after revascularization, the levels of fibrinogen and CRP were significantly higher than in controls. These markers increased within 12 months of observation: CRP level increased almost two-fold and fibrinogen only by about 10%. All examined cytokines in PAD patients with restenosis were higher than in those without restenosis, but the difference was significant only for IL-10 and bFGF. But increased cytokines in patients with restenosis were within the laboratory norms specified by reagent producers except of TGF- $\beta$ 1.

## Conclusions.

1. In PAD patients after endovascular revascularization the levels of CRP and fibrinogen during one year observation significantly increased.
2. In these patients, significant correlation was observed between pro-inflammatory CRP and anti-inflammatory IL-10.
3. The concentrations of CRP, fibrinogen and cytokines (IL-6, bFGF, TGF- $\beta$ 1 and IL-10) were also higher in PAD patients with restenosis indicating the involvement of low-grade inflammation in this process.

**Key words:** inflammatory markers, PAD, endovascular revascularization, restenosis

## Adres do korespondencji:

prof. dr hab. n. med. Maria Kotschy  
Wojewódzki Szpital Specjalistyczny,  
Ośrodek Badawczo-Rozwojowy we Wrocławiu  
ul. H.M. Kamieńskiego 73a, 51–124 Wrocław  
tel.: (+48 71) 327 01 35

## Streszczenie

**Wstęp.** Zapalenie odgrywa kluczową rolę w powstawaniu i rozwoju miażdżycy tętnic, także u pacjentów z miażdżycą tętnic kończyn dolnych (PAD). Zabiegi rewaskularyzacyjne stanowią czynnik ryzyka, który nasila ten proces, niekiedy prowadząc do powstania restenoz.

**Cel.** Oznaczenie stężenia fibrynogenu, białka C-reaktywnego (CRP), interleukin 6 i 10 (IL-6 i IL-10), zasadowego czynnika wzrostu fibroblastów (bFGF) i transformującego czynnika wzrostu (TGF- $\beta$ 1) we krwi chorych z PAD po obwodowej, wewnątrznaczyniowej rewaskularyzacji i u pacjentów z restenozami.

**Materiał i metody.** Przebadano 150 pacjentów z PAD, w tym 90 mężczyzn i 60 kobiet w wieku 50–88 (średnio 65,5) lat. Podczas 12-miesięcznej obserwacji po obwodowej, wewnątrznaczyniowej rewaskularyzacji u 38 pacjentów powstały restenozy. Grupa kontrolna dla oznaczanych cytokin składała się z 15 klinicznie zdrowych osób w wieku 60–83 lat bez niedokrwienia kończyn dolnych. Krew pobierano na czczo do 3,2% cytrynianu sodu w proporcji 9:1 (do oznaczenia fibrynogenu i CRP) i 2,6 ml krwi mieszano z EDTA do pomiaru cytokin: IL-6, IL-10, bFGF, TGF- $\beta$ 1. Cytokiny badano przy użyciu komercyjnych zestawów metodą immunoenzymatyczną, a fibrynogen i CRP za pomocą analizatora koagulologicznego.

**Wyniki.** We krwi pacjentów z PAD po obwodowej rewaskularyzacji stężenie fibrynogenu i CRP było wyższe od normy laboratoryjnej. Podczas 12-miesięcznej obserwacji parametry te nadal wzrastały: CRP prawie dwukrotnie, a fibrynogen tylko o około 10%. Z badanych cytokin tylko IL-10 i bFGF różniły się istotnie statystycznie od grupy kontrolnej. Cytokiny były również wyższe u pacjentów z powstałymi restenozami, mieściły się jednak, z wyjątkiem TGF- $\beta$ 1, w szerokich normach laboratoryjnych podanych przez producentów testów.

## Wnioski.

1. U pacjentów z PAD po wewnątrznaczyniowej rewaskularyzacji stężenie CRP i fibrynogenu podczas rocznej obserwacji wyraźnie się zwiększyło.
2. U tych pacjentów obserwowano istotną korelację między prozapalnym CRP i przeciwzapalną interleukiną 10.
3. Stężenie CRP, fibrynogenu i cytokin: IL-6, bFGF, TGF- $\beta$ 1 i IL-10 zwiększało się także po powstaniu restenoz u pacjentów z PAD, potwierdzając udział w tym procesie miernie nasilonego zapalenia.

**Słowa kluczowe:** markery zapalenia, miażdżycza tętnic kończyn dolnych, wewnątrznaczyniowa rewaskularyzacja, restenoza

Acta Angiol 2014, 20, 2: 47–59

## Introduction

Atherosclerosis is the major cause of myocardial infarction, stroke and gangrene of lower extremities. This disease is responsible for over 50% of deaths in the USA, Europe and Japan [1]. In the pathomechanism of atherosclerosis, the major role refers to the damage of the arterial wall by pathogenic factors, e.g. oxidized lipids, hypertension, components of tobacco smoke, various infections or mechanical and postoperative injuries. Damage to the arterial wall results in excessive proliferation of endothelial and smooth muscle cells in the vessels and the accumulation of inflammatory and immune cells in the injured site. The activation of these cells triggers many inflammatory markers, cytokines, growth factors and vasoregulatory molecules which participate in this process. Atherosclerosis, including peripheral arterial disease (PAD), has been classified as an inflammatory disease. Inflammation is associated with the pathophysiology and clinical progress of atherosclerosis in various vascular regions [2–4]. Currently,

## Wstęp

Miażdżycza tętnic jest główną przyczyną zawałów serca, udarów mózgu i zgorzeli kończyn dolnych. Choroba ta jest odpowiedzialna za ponad 50% zgonów w Stanach Zjednoczonych Ameryki, Europie i Japonii [1]. W patomechanizmie miażdżycy główną rolę przypisuje się uszkodzeniu ściany tętnicy przez patogenne czynniki jak: utlenowane lipidy, nadciśnienie tętnicze, składniki dymu tytoniowego, różne infekcje oraz mechaniczne lub operacyjne urazy. Uszkodzenie ściany tętnicy powoduje nadmierną proliferację komórek śródbłonka i mięśni gładkich naczyń oraz nadmierne nagromadzenie komórek zapalnych i immunologicznych. Aktywacja tych komórek powoduje uwalnianie wielu różnych markerów zapalenia: cytokin, czynników wzrostu, cząsteczek naczynioregulacyjnych, które uczestniczą w tym procesie. Miażdżycę tętnic różnych obszarów naczyniowych, włączając PAD, sklasyfikowano jako chorobę zapalną. Zapalenie związane jest zarówno z patomechanizmem, jak i klinicznym przebie-

a number of experimental and clinical studies are being carried out in different countries on inflammation mediators and pro-inflammatory cytokines in various human diseases [5]. Previous studies also demonstrated that patients with PAD have increased blood coagulation, thrombotic and embolic complications [6–8]. Currently, researchers point out the close correlation between blood coagulation, fibrinolysis and vascular inflammation [9, 10]. Certain pro-inflammatory cytokines, e.g. interleukin-6 (IL-6), can activate blood coagulation and fibrinolysis, while interleukin-10 (IL-10) can inhibit tissue factor and, indirectly, atherosclerosis development [5, 10, 11].

Fibrinogen, C-reactive protein (CRP) and cytokines: IL-6, tumour necrosis factor (TNF) and IL-10 are the most frequently described inflammatory markers in atherosclerosis, particularly in patients with coronary artery disease, but also in PAD [5, 12–15]. Fibrinogen, synthesized in the liver, is therefore an important blood clotting factor, but also, like CRP is a general inflammatory marker. C-reactive protein is also synthesized in the liver. Increased CRP activity is a response to general inflammatory stimuli mediated by the system of interleukins [16, 17]. CRP is a marker of the grade of the inflammatory process, but also indirectly indicates a cytokine-dependent inflammatory process in the arterial wall, macrophage activation and proliferation of endothelial and smooth muscle cells in the vessels. The inflammatory process is associated with the formation of atherosclerotic plaques, but is also intensified in patients who are subject to revascularization, both surgical (e.g. endarterectomy or bypass surgery) and endovascular (e.g. angioplasty, with or without stent implantation), to improve revascularization in the lower extremities [18]. The inflammatory process is also associated with the formation of in-stent restenosis or postoperative arterial thrombosis [14, 19, 20]. The pathophysiology of restenosis has not been fully explained. It is claimed that the proliferation of smooth muscle cells at the injury site, and neointimal hyperplasia, induces the formation of thrombus and narrows the arterial lumen. The results of Tschöpl and al. indicate that high levels of pro-coagulant factors and persistent thrombin generation by haemostatic system might promote restenosis [21]. Increased levels of CRP also indicate an increased risk of thrombosis or restenosis after revascularization in patients with lower limb ischaemia [2, 14, 22–25]. Most cytokines synthesized by various blood cells and arterial walls have a pleiotropic effect. In many cases, one type of cytokine may functionally, in part or completely, replace the other. Interleukin 6 (IL-6) with 26 kD molecular weight is a cytokine synthesized by monocytes,

giem choroby [2–4]. Obecnie prowadzone są w różnych krajach badania doświadczalne i kliniczne nad mediatorami zapalenia i pro-zapalnymi cytokinami w różnych chorobach [5]. Wcześniej prowadzone badania wykazały u pacjentów z PAD zwiększoną krzepliwość krwi i powikłania zakrzepowo-zatorowe [6–8]. Obecnie badania zwracają uwagę na ścisłe związki między procesami krzepnięcia krwi, fibrynolizy i zapalenia naczyń [9, 10]. Pewne prozapalne cytokiny (np. interleukina 6 — IL-6) mogą aktywować proces krzepnięcia krwi i fibrynolizy, a przeciwzapalna interleukina 10 (IL-10) hamuje czynnik tkankowy (TF, *tissue factor*) indukujący proces krzepnięcia, a pośrednio miażdżycę tętnic [5, 10, 11]. Fibrynogen, C-reaktywne białko (CRP, *C-reactive protein*) i cytokina IL-6, czynnik martwicy nowotworów (TNF, *tumor necrosis factor*) i IL-10 są najczęściej opisywanymi czynnikami zapalnymi w miażdżycy tętnic, szczególnie w chorobie niedokrwiennej serca, lecz także w PAD [5, 12–15]. Fibrynogen syntetyzowany w wątrobie jest nie tylko ważnym czynnikiem krzepnięcia krwi, lecz także głównym markerem zapalenia, podobnie jak CRP. Białko C-reaktywne jest również syntetyzowane w wątrobie. Zwiększona aktywność CRP jest odpowiedzią na główne bodźce zapalenia stymulowane przez układ interleukin [16, 17]. CRP jest markerem ogólnego procesu zapalnego w organizmie człowieka, lecz pośrednio wskazuje na zależne od cytokin zapalenie toczące się w obrębie ściany tętnicy, aktywację makrofagów, proliferację komórek śródbłonna i mięśni gładkich naczyń. Proces zapalny jest także związany z wytworzeniem blaszki miażdżycowej, szczególnie u pacjentów poddawanych rewaskularyzacji, zarówno chirurgicznej (np. udrożnienia i połączenia omijające), jak i wewnątrznacyniowej [np. angioplastyka (PTA, *percutaneous transluminal angioplasty*) bez lub ze stentowaniem], celem poprawy ukrwienia w obrębie kończyn dolnych [18]. Proces zapalny jest także związany z powstawaniem restenoz w stentach (ISR, *in-stent restenosis*) lub pooperacyjnych zakrzepów tętnicznych [14, 19, 20]. Patomechanizm powstawania restenoz nie jest w pełni wyjaśniony. Uważa się, że proliferacja komórek śródbłonna i mięśni gładkich oraz powstanie przerostu błony wewnętrznej w miejscu uszkodzenia ściany powoduje wytworzenie przyściennego zakrzepu i zwężenie światła tętnicy. Wyniki badań Tschöpla i wsp. wskazują, że wzrost aktywności prokoagulatoryjnej i ciągła generacja trombiny w układzie krzepnięcia krwi może promować restenozę [21]. Zwiększone stężenie CRP może także wskazywać na ryzyko zakrzepicy lub restenozy po rewaskularyzacji pacjentów z PAD [2, 14, 22–25]. Większość cytokin syntetyzowanych przez różne komórki krwi lub ściany naczyń ma działanie

macrophages, B and T lymphocytes and endothelial cells in blood vessels. It is one of the factors responsible for haemostasis, the synthesis of blood clotting factors in the liver, and its level is increased in various disseminated intravascular coagulation diseases (DIC) [9].

Interleukin 10 (IL-10) with 35 kD molecular weight is also synthesized by monocytes, macrophages and T lymphocytes, but has an anti-inflammatory effect. It inhibits the synthesis of tissue factor (TF) in arterial wall, suppressing the activation of the extrinsic pathway of coagulation and, indirectly, the atherosclerotic process [5, 10, 26].

Transforming growth factor beta-1 (TGF- $\beta$ 1) is synthesized by most of the nuclear cells, including fibroblasts, macrophages, lymphocytes and endothelial cells. Its molecular weight is 25 kD; it has a homodimeric structure and is activated by plasmin [9]. TGF- $\beta$ 1 promotes the *in vitro* transformation of fibroblasts into tumour-like cells. Studies by Taniguchi et al. demonstrated that this cytokine is involved in the thickening of the arterial wall and reducing the expression of thrombomodulin (TM) [2, 27].

Another cytokine studied by us, the basic fibroblast growth factor (bFGF), is involved in many normal processes, such as angiogenesis, wound healing, differentiation and tissue repair, and its levels is correlated with the tissue vascularization level [9, 10]. Despite many experimental and clinical studies, the activity of these cytokines in humans with different diseases, particularly PAD, has not been fully explained.

### Aim

1. To determine the levels of fibrinogen, C-reactive protein (CRP), interleukin 6 (IL-6), interleukin 10 (IL-10) basic fibroblast growth factor (bFGF) and transforming growth factor beta 1 (TGF- $\beta$ 1) in the blood of patients with PAD after endovascular revascularization of lower limbs.
2. To observe these patients for 12 months for appearance of restenosis.
3. To compare the inflammatory factors in both groups of PAD patients after endovascular revascularization — before and after restenosis.

### Material and methods

The study included 150 patients with PAD who underwent endovascular revascularization at the Angiology and Vascular Surgery Centres in Wrocław and Krakow. These patients were referred to the Angiology Unit of the Regional Specialist Hospital in Wrocław. There were 90 men and 60 women, aged 44 to 88 (mean 65.5 years). One man withdrew his consent to

pleiotropowe. W wielu przypadkach jeden typ cytokin może czynnościowo, częściowo lub całkowicie zastępować inne. IL-6 o masie cząsteczkowej 26 kD jest cytokiną syntetyzowaną przez monocyty, makrofagi, limfocyty B i T oraz komórki śródbłonna naczyń. Jest jedną z cytokin odpowiedzialnych za hemostazę — szczególnie syntezę czynników krzepnięcia krwi w wątrobie. Stężenie IL-6 wzrasta w różnych zespołach wewnątrznacyniowego wykrzepiania [9]. IL-10 o masie cząsteczkowej 35 kD także jest syntetyzowana przez monocyty, makrofagi i limfocyty T, lecz ma działanie przeciwzapalne. Hamuje syntezę TF w ścianie tętnic, zmniejszając nasilenie zewnątrzpo pochodnego krzepnięcia krwi, a pośrednio proces miażdżycy tętnic [5, 10, 26]. Transformujący czynnik wzrostu (TGF- $\beta$ 1, *transforming growth factor  $\beta$ 1*) jest wytwarzany przez większość komórek jądrzastych, włączając fibroblasty, makrofagi, limfocyty i komórki śródbłonna. Ma masę cząsteczkową wynoszącą 25 kD i strukturę homodimeryczną, a aktywowany jest przez plazminę [9]. TGF- $\beta$ 1 promuje *in vitro* transformację fibroblastów w komórki nowotworopodobne. Badania Taniguchi i wsp. wykazały, że ta cytokina powoduje zgrubienie ściany tętnicy i zmniejszenie na niej ekspresji trombomoduliny (TM) [2, 27]. Inna badana przez nas cytokina — zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF, *basic fibroblast growth factor*) bierze udział w wielu prawidłowych procesach, takich jak angiogeneza, gojenie ran, różnicowanie i naprawa tkanek. Jej stężenie koreluje ze stopniem unaczynienia tkanek [9, 10]. Mimo wielu badań doświadczalnych i klinicznych działanie tych cytokin u ludzi w rozmaitych chorobach, szczególnie w PAD, nie jest w pełni znane.

### Cel

1. Oznaczenie fibrynogenu, CRP, IL-6, IL-10, bFGF i TGF- $\beta$ 1 u pacjentów z PAD po obwodowej, wewnątrznacyniowej rewaskularyzacji kończyn dolnych.
2. Obserwacja pacjentów w ciągu 12 miesięcy do czasu powstania restenozy.
3. Porównanie czynników zapalenia u pacjentów z PAD po wewnątrznacyniowej rewaskularyzacji oraz przed i po powstaniu restenozy.

### Materiał i metody

Badaniem objęto 150 pacjentów z PAD po przeprowadzeniu wewnątrznacyniowej rewaskularyzacji w Ośrodkach Angiologicznych i Chirurgii Naczyniowej we Wrocławiu i w Krakowie. Wśród pacjentów było 90 mężczyzn i 60 kobiet w wieku 44 do 88 (średnio 65,5) lat. Jeden mężczyzna wycofał swoją zgodę na udział w badaniu, a 2 zmarło w okresie obserwacji z powodu złośliwych nowotworów. Pacjenci ci nie zostali



participate in the study, and two patients died during the observation period due to malignant cancer. These patients were excluded from the examined group. Patients were recruited between 18.08.2010 and 28.06.2012, and a revascularization procedure had been performed from 1 to 18 months before recruitment. The time from revascularization procedure (PTA and/or stenting of iliac, femoral, popliteal and crural arteries) was one to 3 months in 77 patients, over 3 to 6 months — in 30 patients and over 6 months — in 43 patients. In these patients detailed medical history was obtained and physical examination, basic blood and biochemical laboratory tests and clinical observations were carried out every 3 months with blood collection (5 times over one year). Eighteen patients had small ischaemic ulcers on the extremities with stable inflammation (CRP =  $5.2 \pm 3.7$  mg/l). Intermittent claudication and ankle brachial pressure index (ABPI) were also measured. Ankle brachial pressure index (ABPI) below 0.9 on the right extremity was found in 63 (42%) patients and on the left extremity in 76 (50.7%) patients. In 11 patients, ABPI was below 0.5. Patients had previously been treated with angioplasty (PTA) alone — 21, angioplasty plus stent implantation — 80 or stent implantation alone — 49 patients. The ischaemia of the lower limbs was diagnosed based on an ultrasonography scan (USG duplex Doppler), computed tomography and arteriography. Of the patients included in the study, 101 (67.0%) had various forms of ischaemic heart disease (in some patients with myocardial infarction), 126 (84.0%) arterial hypertension, 120 (80.0%) hyperlipidaemia, 90 (60.0%) were ex-smokers, 41 (27.3%) current smokers, and 19 (12.7%) never-smokers. Ninety one (60.6%) PAD patients were diagnosed with type 2 diabetes and 115 (76.6%) were overweight or obese. All revascularization procedures were successful. No amputations were performed. In 38 PAOD patients new restenosis occurred within 12 months of observation. Control group for cytokines consisted of 15 clinically healthy subjects aged 60–83 years without cardiovascular symptoms, but who reported a number of risk factors.

Blood samples (4.5 ml) were drawn from the cubital vein in the morning in a fasting state and put into a test tube with 0.5 ml of 3.2% sodium citrate. Plasma with sodium citrate was analyzed for levels of fibrinogen and CRP. Cytokines were determined in 2.6 ml blood samples mixed with EDTA. Plasma was obtained through centrifuging at 2500 g for 15 minutes. 0.2 ml plasma samples were then distributed to Eppendorf test tubes and frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until they were used for testing. The plasma levels of tested cytokines were determined using commercial kits for enzyme immu-

ujęci w badaniu. Pacjentów rekrutowano w okresie od 18.08.2010 do 28.06.2012 r., a zabiegi rewaskularyzacyjne przeprowadzono na 1–18 miesięcy przed rekrutacją: po PTA i/lub implantacji stentów: tętnic biodrowych, udowych, podkolanowych i podudzia. 1–3 miesięcy po zabiegu było 77 pacjentów, 3–6 miesięcy — 30 chorych i 6–30 miesięcy — 43 pacjentów. U chorych przeprowadzono dokładny wywiad, badanie przedmiotowe oraz laboratoryjne badania biochemiczne i badanie obrazu krwi. Obserwację kliniczną pacjentów z pobraniem próbek krwi przeprowadzono co 3 miesiące, 5-krotnie w ciągu roku. Osiemnastu pacjentów miało niewielkie owrzodzenia niedokrwienne stóp ze stałym odczynem zapalnym (CRP =  $5,2 \pm 3,7$  mg/l). Mierzono też chromanie przestankowe i współczynnik kostka/ramię (ABPI, *ankle brachial pressure index*). ABPI poniżej 0,9 na prawej kończynie dolnej miało 63 (42%) chorych, na lewej kończynie 76 (50,7%); 11 pacjentów miało ABPI poniżej 0,5. Przed rekrutacją pacjenci leczeni byli angioplastyką — 21 chorych, angioplastyką ze stentowaniem — 80 lub samym stentowaniem — 49. Diagnostykę stopnia ukrwienia kończyn dolnych oparto na badaniu ultrasonograficznym (USG duplex Doppler), tomografii komputerowej i arteriografii. Wśród pacjentów włączonych do badania u 101 (67%) stwierdzono chorobę niedokrwienną serca, u niektórych z przebyłym zawałem; 126 (84%) miało nadciśnienie tętnicze, 120 (80%) — hiperlipidemię, 90 (60%) — dawniej paliło papierosy, 41 (27,3%) — pali obecnie, a nigdy nie paliło 19 (12,6%). Cukrzycę typu 2 rozpoznano u 91 (60,6%), a nadwagę i otyłość u 115 (76,6%) pacjentów. Po skutecznej rewaskularyzacji nie stwierdzono wczesnych powikłań. Nie przeprowadzono amputacji i nikt z pacjentów nie zmarł. W ciągu rocznej obserwacji u 38 pacjentów powstały nowe restenozy. Przebadano także grupę referencyjną 15 osób w wieku 60–80 lat bez klinicznych objawów ze strony układu sercowo-naczyniowego, lecz z podobnymi czynnikami ryzyka w zebrany wywiadzie, jak w grupie pacjentów z PAD.

Próbki krwi w ilości 4,5 ml pobierano pacjentom rano na czczo z żyły odłokciowej do 0,5 ml 3,2% cytrynianu sodu. W osoczu cytrynianowym przeprowadzono badania stężeń fibrynogenu i CRP. Do oznaczenia cytokin użyto 2,6 ml krwi pobranej na EDTA. Osocze uzyskiwano przez wirowanie przy 2500 g przez 15 min. Następnie osocze rozpipetowano po 0,2 ml do próbek Eppendorfa i zamrażano w temp.  $-80^{\circ}\text{C}$  do czasu przeprowadzenia badań. Osoczowe stężenia badanych cytokin oznaczano przy zastosowaniu komercyjnych zestawów metodą immunoenzymatyczną, a stężenie fibrynogenu i CRP przy użyciu analizatora koagulologicznego. Użyto następujących testów:

noassays; fibrinogen and CRP levels were measured with a coagulometer.

The following commercial kits were used for the determination of individual parameters:

1. Fibrinogen – Multibren U, Siemens;
2. CRP — CRP VARIO, Abbott;
3. IL 6 — Human IL 6 Quantikine ELISA, R&D Systems;
4. IL 10 — Human IL 10 Quantikine ELISA, R&D Systems;
5. bFGF — Human bFGF Quantikine ELISA, R&D Systems;
6. TGF- $\beta$ 1 — Human TGF- $\beta$ 1 Quantikine ELISA, R&D Systems.

The protocol of the study was approved by the Bioethical Committee at the Regional Specialist Hospital in Wrocław.

### Statistical analysis

Results are presented in tables as mean values (M), standard deviation (SD), medians (Me) and interquartile range (lower Q1 and upper Q3). Normality of distribution was assessed using D'Agostino-Pearson test. The statistical significance of differences between groups was analyzed with the T-student test or nonparametric Mann-Whitney test (in case of non-normal data). The correlations between the measured parameters characterized by non-normal data distribution were calculated using the Spearman rank correlation coefficient ( $r_s$ ) with significance level  $p$ . The level of statistical significance was adopted at  $p < 0.05$ . Statistical analysis was performed with R for Windows (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) and MedCalc for Windows (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium).

### Results

Table 1 presents parameters most frequently determined in inflammatory diseases, i.e. levels of fibrinogen and CRP, in patients with PAD after endovascular revascularization.

In comparison with the most commonly used laboratory normal values for fibrinogen (1.8–3.5 g/l) and for CRP (below 5 mg/l), 71 (47.3%) patients with PAD had elevated fibrinogen concentration, and 50 (33.3%) patients had elevated CRP levels. However, when the results were compared with the normal value for CRP proposed by Nijm et al. in 2005 ( $1.3 \pm 1.1$  mg/l), as many as 97 (64.7%) patients presented with increased CRP levels. Unfortunately, we did not perform these studies in our own control group; more detailed data are presented in Figure 1.

We determined the levels of fibrinogen and CRP in all patients from the study group (150 subjects) every

1. Fibrinogen — Multibren Siemens;
2. CRP — CRP VARIO Abbott;
3. IL-6 — Human IL-6 Quantikine ELISA, R&D System;
4. IL-10 — Human IL-10 Quantikine ELISA, R&D System;
5. bFGF — Human bFGF Quantikine ELISA, R&D System;
6. TGF- $\beta$ 1 — Human TGF- $\beta$ 1 Quantikine ELISA, R&D System.

Komisja Bioetyczna przy Wojewódzkim Szpitalu Specjalistycznym we Wrocławiu wyraziła zgodę na przeprowadzenie badań.

### Analiza statystyczna

Wyniki analizy statystycznej zostały przedstawione w tabelach w postaci średnich (M), odchyłeń standardowych (SD), median (Me) oraz przedziału kwartylowego (Q1–Q3). Normalność rozkładu zmiennych została zweryfikowana za pomocą testu D'Agostino-Pearsona. Istotność różnic pomiędzy dwiema ilościowymi zmiennymi została zbadana za pomocą testu t-Studenta lub nieparametrycznego testu Manna-Whitneya (w przypadku braku normalności rozkładu). Liniowa zależność pomiędzy zmiennymi ilościowymi została oceniona za pomocą współczynnika korelacji Spearmana. Wszystkie testy zostały wykonane przy poziomie istotności  $p < 0,05$ . Analiza statystyczna została wykonana za pomocą pakietu statystycznego R w wersji dla Windows (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) oraz MedCalc dla Windows (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium).

### Wyniki

Tabela 1 ilustruje parametry najczęściej przedstawiane w chorobach zapalnych, tj. stężenie fibrynogenu i CRP u 150 pacjentów z PAD po obwodowej, wewnątrznaczyniowej rewaskularyzacji.

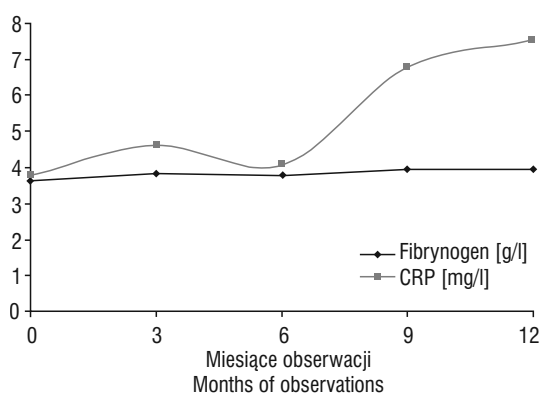
W porównaniu z najczęściej przyjmowanymi normami laboratoryjnymi dla fibrynogenu (1,8–3,5 g/l) i dla CRP (poniżej 5 mg/l) 71 (47,3%) pacjentów z PAD po wewnątrznaczyniowej rewaskularyzacji miało podwyższone stężenie fibrynogenu i 50 (33,3%) — podwyższone stężenie CRP. Jednak jeżeli porówna się stężenie CRP u naszych pacjentów z normą zaproponowaną przez Nijma i wsp. w 2005 r. ( $1,3 \pm 1,1$  mg/l) to aż 97 (64,7%) pacjentów będzie miało podwyższone stężenie CRP. Niestety, nie przeprowadzaliśmy własnych badań stężenia fibrynogenu i CRP w grupie kontrolnej. Lepiej te parametry są przedstawione na rycinie 1.

Na rycinie 1 przedstawiono stężenie fibrynogenu i CRP u wszystkich 150 pacjentów z PAD. Parametry te oznaczano co 3 miesiące, a więc 5-krotnie w ciągu roku.

**Tabela I.** Fibrynogen i CRP u pacjentów z PAD po wewnątrznaczyniowej rewaskularyzacji  
**Table I.** Fibrinogen and CRP in patients with PAD after endovascular revascularization

Badane parametry (normy) Examined parameters (normal values)	PAD (n = 150)		PAD		
	M ± SD Me Q1–Q3	W normie Within normal range (n)	(%)	Powyżej normy Above normal range (n)	(%)
Fibrynogen (1,8–3,5 g/l)	3,7 ± 0,95 3,5 3,1–4,1	79	52,7	71	47,3
CRP (< 5,0 mg/l)	4,34 ± 8,48 2,13	100	66,7	50	33,3
CRP* (< 1,3 mg/l)	0,97–5,42	53	35,3	97	64,7

\*na podstawie Nijm et al. [5]; PAD (peripheral arterial disease) — miażdżycza tętnic kończyn dolnych; CRP (C-reactive protein) — białko C-reaktywne; M (mean) — średnia; SD (standard deviation) — odchylenie standardowe; Me (median) — mediana; Q (quartils) — kwartyle



**Rycina 1.** Fibrynogen i białko C-reaktywne (CRP) podczas rocznej obserwacji pacjentów z miażdżyczą tętnic kończyn dolnych po wewnątrznaczyniowej rewaskularyzacji

**Figure 1.** Fibrinogen and C-reactive protein during 1 year observation in PAD patients after endovascular revascularization

3 months (5 times over a year). The lowest (yet elevated) mean levels of fibrinogen and CRP were found shortly after revascularization. The levels of these markers increased over 3-months intervals, and the increase for CRP was more pronounced than that for fibrinogen.

Table 2 presents the levels of 4 cytokines (IL-6, IL-10, bFGF and TGF- $\beta$ 1) in 150 patients with PAD after peripheral endovascular revascularization and in 10 control subjects. Laboratory normal values specified by the producers of reagents are also presented. In the group of patients, a statistically significant increase in comparison with the controls was only found for IL-10 and lower for bFGF levels, while the concentrations of IL-6 and TGF- $\beta$ 1 increased insignificantly. All cytokine levels were within the specified normal limits, apart from TGF- $\beta$ 1 which levels were several times higher.

Najmniejsze stężenie fibrynogenu i CRP (już znacznie podwyższone) występowało miesiąc po rewaskularyzacji, a w odstępach 3-miesięcznych nadal się zwiększało, lecz wzrost poziomu CRP był większy niż fibrynogenu.

Tabela 2 przedstawia stężenie 4 cytokin: IL-6, IL-10, bFGF i TGF- $\beta$ 1 u 150 pacjentów z PAD po obwodowej, wewnątrznaczyniowej rewaskularyzacji. Włączono także niewielką grupę kontrolną, ponieważ producenci testów przedstawili własne szerokie normy laboratoryjne. W badanej grupie pacjentów w porównaniu do grupy kontrolnej stwierdzono tylko istotnie statystycznie wyższe stężenie IL-10 i niższy bFGF, podczas gdy stężenie IL-6 i TGF- $\beta$ 1 nie różniło się istotnie statystycznie.

Poza stężeniem TGF- $\beta$ 1, które było kilkakrotnie wyższe od normy, lecz w obu grupach (badanej i kontrolnej) podobne, pozostałe cytokiny mieściły się w granicach norm podanych przez producentów.

Przeliczono także wzajemne korelacje między badanymi markerami zapalenia i cytokinami, ale w tabeli 3 przedstawiono tylko statystycznie istotne zależności.

W tabeli 4 przedstawiono wszystkie badane parametry zapalenia u 38 pacjentów z PAD, u których w czasie rocznej obserwacji powstały restenozy. U tych pacjentów z restenozami wszystkie badane parametry były wyższe niż 3 miesiące wcześniej, przed powstaniem restenoz, ale tylko różnice stężenia fibrynogenu i TGF- $\beta$ 1 były statystycznie istotne.

Ciekawe jest spostrzeżenie przedstawione na rycinie 2, że marker prozapalny CRP koreluje z wysoką istotnością z czynnikiem przeciwzapalnym IL-10 ( $p < 0,0007$ ), co wskazuje na wspólne ich działanie w procesie zapalenia.

## Omówienie

Przebadano 150 pacjentów z PAD leczonych angioplastyką bez lub ze stentowaniem oraz samą implantacją

**Tabela 2.** Wybrane cytokiny u pacjentów z miażdżycą tętnic kończyn dolnych po wewnątrznaczyniowej rewaskularyzacji  
**Table 2.** Some cytokines in patients with PAD after endovascular revascularization

Cytokiny Cytokines [pg/ml]	Normy laboratoryjne Laboratory normal values [pg/ml]	PAD (n = 150) M ± SD Me Q1-Q3	n	Kontrole Controls M ± SD Me Q1-Q3	Poziom istotności Significance level
IL-6	3,1–12,5	3,8 ± 5,6 1,4 0,5–4,3	10	2,8 ± 3,0 1,8 1,5–2,7	0,482
IL-10	< 7,8	6,0 ± 14,8 1,6 1,0–4,6	15	1,7 ± 1,8 1,0 1,1–5,3	< 0,027
bFGF	< 14,6	3,54 ± 6,29 1,00 1,00–3,38	15	3,84 ± 3,39 3,22 1,12–5,27	< 0,046
TGF-β1	903–1654 1165 ± 214	4447 ± 2869 3519 2211–6048	10	5141 ± 2628 5134 2957–6982	0,3174

PAD (*peripheral arterial disease*) — miażdżycza tętnic kończyn dolnych; IL-6 — interleukina 6; IL-10 — interleukina 10; bFGF (*basic fibroblast growth factor*) — zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów; TGF-β1 (*transforming growth factor β1*) — transformujący czynnik wzrostu β1; M (*mean*) — średnia; SD (*standard deviation*) — odchylenie standardowe; Me (*median*) — mediana; Q (*quartils*) — kwartyle

**Tabela 3.** Istotne korelacje między badanymi czynnikami zapalenia u pacjentów z miażdżycą tętnic kończyn dolnych po wewnątrznaczyniowej rewaskularyzacji

**Table 3.** Significant correlations between examined inflammatory factors in patients with PAD after endovascular revascularization

	CRP	Fibrynogen
Fibrynogen	$r_s$ 0,424 p < 0,0001	
IL6	$r_s$ 0,379 p < 0,0001	0,336 < 0,0001
TGF-β1	$r_s$ 0,196 p 0,0174	0,192 0,0202
IL-10	$r_s$ 0,277 p 0,0007	
bFGF	$r_s$ -0,164 p 0,047	

PAD (*peripheral arterial disease*) — miażdżycza tętnic kończyn dolnych; CRP (*C-reactive protein*) — białko C-reaktywne; IL-6 — interleukina 6; IL-10 — interleukina 10; bFGF (*basic fibroblast growth factor*) — zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów; TGF-β1 (*transforming growth factor-beta 1*) — transformujący czynnik wzrostu β1;  $r_s$  (*spearman rank correlation coefficient*) — współczynnik korelacji Spearmana; p (*significance level*) — poziom istotności

We calculated also the correlations between the tested inflammatory markers and cytokines in patients with PAD after endovascular revascularization. Results of significant correlations are demonstrated in table 3.

Table 4 presents all tested inflammatory parameters in 38 patients with PAD, who, at various time points of observation, developed restenosis. In table 4 are comprised the results 3 months before and after the

stentów z dobrym rezultatem. Nie przeprowadzono amputacji i nikt z pacjentów nie zmarł z powodu niedokrwienia kończyn. Jednak u badanych przez nas chorych występowały wszystkie czynniki ryzyka miażdżycy i poważne choroby: najczęściej niedokrwienna choroba serca wraz z przebyłym zawałem, nadciśnienie tętnicze, hiperlipidemia, cukrzyca typu 2 i palenie tytoniu. Z tego powodu chorzy byli intensywnie leczeni różnymi lekami sercowo-naczyniowymi, hipotensyjnymi, antykoagulantami, statynami i lekami przeciwcukrzycowymi. Stąd powstaje pytanie: czy uzyskane wyniki można odnieść do choroby zasadniczej tj. PAD czy przeprowadzonego zabiegu rewaskularyzacyjnego. Proces zapalny jest związany z patogenezą i rozwojem miażdżycy [3, 4, 20]. Oba rodzaje rewaskularyzacji zwężonych lub niedrożnych tętnic: chirurgiczna (mechaniczne udrożnienia lub chirurgia przeszczepów omijających) i wewnątrznaczyniowa (balonowa angioplastyka bez lub z implantacją stentów) mogą nasilać reakcję zapalną, podobnie jak w powstałych w stentach restenozach lub w zakrzepach tętniczych utworzonych w następstwie rewaskularyzacji [16, 23].

Markery zapalenia krążące we krwi, np. CRP, fibrynogen czy amyloid A, odzwierciedlają aktywność choroby, a pośrednio wskazują też na aktywację makrofagów i proliferację komórek śródbłonna i mięśni gładkich naczyń [19, 22, 24]. Jednak w 2008 r. Brevetti i wsp. uznali mieloperoksydazę za lepszy mediator zapalenia niż CRP [28]. Stężenie fibrynogenu i CRP w naszych badaniach u pacjentów z PAD po wewnątrznaczyniowej



**Tabela 4.** Porównanie badanych parametrów u pacjentów z miażdżycą tętnic kończyn dolnych po wewnątrznaczyniowej rewaskularyzacji oraz przed i po powstaniu restenozy**Table 4.** Comparison of examined parameters in patients with PAD after endovascular revascularization without and with restenosis

Badane parametry Examined parameters	PAD (n = 38) Restenoza/Restenosis		Poziom istotności Significance level
	Przed/Before M ± SD Me Q1–Q3	Po/After M ± SD Me Q1–Q3	
Fibrynogen [g/l]	3,6 ± 0,9 3,5 3,2–4,3	4,1 ± 0,9 3,9 3,5–4,8	0,02
CRP [mg/l]	4,1 ± 4,4 2,7 1,0–6,1	6,2 ± 6,9 3,7 1,4–7,8	0,25
IL-6 [pg/ml]	3,8 ± 5,7 1,4 1,0–4,6	5,4 ± 4,5 3,4 2,1–8,2	0,482
IL-10 [pg/ml]	6,2 ± 14,8 1,6 1,0–4,6	7,4 ± 11,0 2,5 1,0–8,4	0,08
bFGF [pg/ml]	3,5 ± 6,3 1 1,0–3,1	4,0 ± 8,0 2,3 1,0–3,8	0,283
TGF-β1 [pg/ml]	4437 ± 2287 3520 2211–6048	7868 ± 6378 5877 4203–9994	0,025

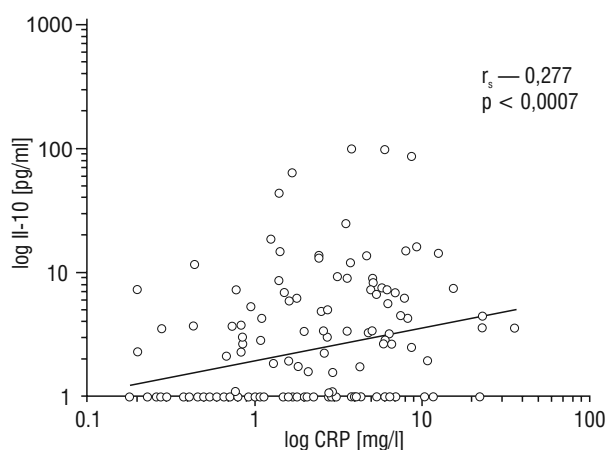
PAD (*peripheral arterial disease*) — miażdżycza tętnic kończyn dolnych; CRP (*C-reactive protein*) — białko C-reaktywne; IL-6 — interleukin 6; IL-10 — interleukina 10; bFGF (*basic fibroblast growth factor*) — zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów; TGF-β1 (*transforming growth factor-beta 1*) — transformujący czynnik wzrostu β1; M (*mean*) — średnia; SD (*standard deviation*) — odchylenie standardowe; Me (*median*) — mediana; Q (*quartils*) — kwartyle

formation of restenosis. Only the fibrinogen ( $p < 0.02$ ) and TGF-β1 ( $p < 0.025$ ) levels were significantly higher in patients with restenosis. The levels of CRP, IL-6 and IL-10 were also higher, but the differences were not statistically significant.

There was an interesting correlation with high significance level between pro-inflammatory CRP and anti-inflammatory IL-10. This indicates on a common action in the inflammation process (Fig. 2).

## Discussion

The studied 150 patients with PAD had ischaemia of the lower extremities and were treated with PTA, with or without stent implantation, with a good outcome and without amputation. The patients were presented with almost all risk factors for atherosclerosis and had many other serious diseases, such as ischaemic heart disease,



**Rycina 2.** Istotna korelacja między prozapalnym CRP i przeciwzapalną IL-10

**Figure 2.** Significant correlation between pro-inflammatory CRP and anti-inflammatory IL-10

often with a history of myocardial infarction, arterial hypertension and type 2 diabetes. For these reasons, the patients received intensive treatment with cardiovascular and antihypertensive drugs, anticoagulants, statins and diabetic drugs. Therefore, it can be questioned as to whether the obtained results may refer solely to ischaemia and procedures on lower extremities or not. Vascular inflammation is associated with the pathogenesis, but also the progression, of atherosclerosis [3, 4, 20]. Both surgical (bypass, mechanical restoration of patency) and endovascular arterial revascularization (balloon angioplasty, with or without stenting) may intensify the inflammatory reaction, similar to restenosis in the implanted stents, or thrombus in surgically or endovascular treated arteries [16, 23]. Inflammatory markers circulating in the blood stream, e.g. CRP, fibrinogen and amyloid A, reflect disease activity and indirectly indicate the activation of macrophages and proliferation of endothelial and smooth muscle cells in the vessels [19, 22, 24]. However, Brevetti et al. (2008) claimed myeloperoxidase to be a more important mediator of inflammation than CRP [2]. The levels of fibrinogen and CRP found in our study are much higher than the values reported by Schillinger et al., who studied PAD patients before endovascular revascularization [17].

As shown in Figure 1, CRP is a much better inflammatory marker than fibrinogen. In the course of one year of observation, fibrinogen levels increased by only about 10%, while the level of CRP more than doubled. As found by Buffon et al., increased CRP levels can predict early complications and late restenosis, although this refers to coronary angioplasty [29]. In the analysis of increased fibrinogen levels in patients with PAD, the fact that these levels are higher in older people than in the young ( $p < 0.02$ ) should be considered. We faced difficulties in the assessment of CRP levels in the studied patients because of the wide limit of the laboratory normal values (up to 5 mg/l). However, we used also normal values proposed by other researchers, e.g. Nijm et al. ( $1.3 \pm 1.1$  mg/l), and found elevated CRP levels in 64.7% of patients, which was in line with the findings of most published studies [20, 24, 25]. In addition, we tested the levels of 4 other cytokines: IL-6, IL-10, bFGF and TGF- $\beta$ 1 in PAD patients after endovascular revascularization. Only IL-10 was higher and bFGF lower than in the control group ( $p < 0.027$  and  $p < 0.046$ ). Levels of IL-6 and TGF- $\beta$ 1 in patients compared were also higher, but not significant. All cytokines except for TGF- $\beta$ 1 were still within the range of normal values. It appears that these parameters do not play an important role in the laboratory diagnostics of PAD. However, if more or less significant correlations between CRP and

rewaskularyzacji było wyższe niż opisane przez Schillinger i wsp. u pacjentów z PAD przed rewaskularyzacją [17]. Jak wynika z ryciny 1, CRP jest lepszym markerem zapalenia niż fibrynogen. Podczas rocznej obserwacji u rewaskularyzowanych pacjentów stężenie fibrynogenu wzrosło tylko o około 10%, natomiast stężenie CRP zwiększyło się ponad dwukrotnie. Zgodnie z poglądem Buffona i wsp. podwyższone stężenie CRP może zapowiadać wczesne powikłania i późne restenozy, jednak odnosi się to do wieńcowej angioplastyki [29]. W ocenie podwyższonego stężenia fibrynogenu u pacjentów z PAD należy wziąć pod uwagę fakt, że u starszych ludzi występuje wyższe stężenie tego białka niż u osób młodszych ( $p < 0,02$ ). U badanych pacjentów z PAD mieliśmy pewne trudności z właściwą oceną stężenia CRP z uwagi na dużą rozpiętość przyjętej normy laboratoryjnej wynoszącej u ludzi zdrowych poniżej 5 mg/l.

Posługując się jednak normami innych badaczy (np. Nijma i wsp.) wynoszącymi  $1,3 \pm 1,1$  mg/l, u 64,7% naszych pacjentów stwierdziliśmy podwyższone stężenie CRP, zgodne z wynikami większości publikacji [20, 24, 25]. Dodatkowo przebadaliśmy u naszych pacjentów z PAD po rewaskularyzacji 4 cytokiny: IL-6, IL-10, bFGF i TGF- $\beta$ 1. Tylko stężenie IL-10 było istotnie wyższe, a bFGF istotnie niższe niż w grupie kontrolnej (odpowiednio  $p < 0,024$  i  $p < 0,046$ ). Poza TGF- $\beta$ 1 pozostałe cytokiny mieszczą się w szerokich normach laboratoryjnych podanych przez producentów testów. Wydaje się, że te cytokiny, mimo że biorą udział w procesie hemostazy, angiogenezy i miażdżycy tętnic, nie odgrywają większej roli w praktycznej diagnostyce PAD i jej powikłań (np. przy powstawaniu restenoz). Jednak nie można pominąć większych lub mniejszych, istotnych korelacji między CRP, fibrynogenem i niektórymi cytokinami, co może mieć znaczenie w patogenezie zakrzepicy i miażdżycy tętnic. Seo i wsp. w 2007 r. obserwowali wysokie stężenie IL-10 u pacjentów z różnymi zespołami rozsianego wewnątrznaczyniowego wykrzepiania (DIC, *disseminated intravascular coagulation*) [26]. W 1999 r. Pinderski i wsp. stwierdzili, że IL-10 blokuje powstawanie miażdżycy tętnic *in vitro* i *in vivo* przez hamowanie uwalniania TF u myszy. IL-10 modyfikuje uszkodzenie komórek śródbłonna przez przyspieszenie adhezji płytek krwi w doświadczeniach *in vitro* [10].

Podczas rocznej obserwacji 150 pacjentów z PAD po wewnątrznaczyniowej rewaskularyzacji, badanych 5-krotnie co 3 miesiące z pobraniem próbek krwi, u 38 osób (25,3%) powstały restenozy. Tabela 4 przedstawia wyniki badań stężenia fibrynogenu, CRP, IL-6, IL-10, bFGF i TGF- $\beta$ 1 u 38 pacjentów z PAD z powstałymi restenozami w porównaniu z wynikami

fibrinogen and all 4 cytokines are considered, the results could be important for the pathogenesis of thrombosis and PAD. Seo et al. (2007), reported high levels of IL-10 in patients with different disseminated intravascular coagulation diseases (DIC) [26]. Also Pinderski et al. reported in 1999 that IL-10 blocks atherosclerotic events in vitro and in vivo and inhibits tissue factor (TF) in mice. IL-10 also plays an active modulatory role in endothelial cell damage and accelerates platelet adhesion in vitro [10].

In table 4, we present the characteristics of 38 patients with PAD after endovascular revascularization, who over one year of observation developed restenosis. For comparison, the parameters of the same patients three months before restenosis are presented. Patients with restenosis had significantly higher levels of fibrinogen and TGF- $\beta$ 1 and also higher, but not statistically significant, were levels of CRP, IL-6 and IL-10. Despite many experimental and clinical studies, the pathomechanism of arterial thrombosis and in-stent restenosis after revascularization in patients with PAD has not been fully explained. It has been claimed that the inflammatory process stimulates endothelial cells and smooth muscle cells proliferation, as well as late neointimal hyperplasia in the surgically and endovascularly treated part of the artery, leading to restenosis [24]. The frequency of restenosis in our patients (about 25.3%) corresponds with the statistics reported by other authors [16, 17]. Vascular stents, particularly those made of polytetrafluoroethylene (ePTFE), are regarded as neutral. However, after implantation in patients, they are covered with an ultra-thin biofilm containing mainly fibrinogen and blood cells, including platelets, which may be involved in the pathomechanism of restenosis [30, 31].

The highest values of CRP were found at 24 to 72 hours after revascularization [17].

Although CRP is a marker of systemic inflammation in the human body, it also plays a role in the assessment of abnormal blood supply to the lower extremities and early and late complications after revascularization procedures [2]. Other cytokines, i.e. bFGF and TGF- $\beta$ 1, despite their low pro-inflammatory activity, are less useful in the clinical assessment of patients with PAD. Our examination connected with CRP level confirms earlier observations of other authors, who recommend the determination of CRP in PAD patients after revascularization to predict early and late thrombotic complications, e.g. as occurrence of restenosis.

u tych samych pacjentów 3 miesiące wcześniej bez restenoz. Wszystkie badane parametry, tj.: CRP, IL-6, IL-10, bFGF, TGF- $\beta$ 1 były u pacjentów z restenozami wyższe niż u chorych z PAD bez restenoz, ale tylko stężenie fibrynogenu ( $p < 0,02$ ) i TGF- $\beta$ 1 ( $p < 0,025$ ) były statystycznie istotnie wyższe. Mimo dość licznych, doświadczalnych i klinicznych badań, patomechanizm powstawania tętnicznych zakrzepic i ISR u pacjentów z PAD po rewaskularyzacji nie jest w pełni wyjaśniony. Przyjmuje się, że proces zapalny stymuluje proliferację komórek śródbłonna i mięśni gładkich naczyń i powstanie zakrzepu, jak również powstanie przerostu błony wewnętrznej w tętnicach uszkodzonych przez wewnątrznacyniową lub chirurgiczną rewaskularyzację. U niektórych pacjentów z PAD proces ten prowadzi do restenoz [24]. Częstość powstawania restenoz u naszych pacjentów wynosiła 25,3%. Liczba ta mieści się w granicach opisywanych przez innych autorów [16, 17]. Stenty naczyniowe, szczególnie z politetrafluoroetylenem (ePTFE) uważa się za neutralne. Jednak po implantacji u ludzi pokrywają się one ultracienką błoną zawierającą głównie fibrynogen i elementy krwi, włączając płytki biorące także udział w patomechanizmie zakrzepicy i restenoz [30, 31].

Najwyższe stężenie CRP występuje 24 do 72 godzin po wewnątrznacyniowej rewaskularyzacji [17]. Jakkolwiek CRP jest markerem ogólnego zapalenia w organizmie człowieka, występuje także w miażdżycy tętnic kończyn dolnych oraz we wczesnych i późnych powikłaniach po rewaskularyzacji [2]. Wydaje się, że bFGF i TGF- $\beta$ 1 są mniej użyteczne w diagnostyce pacjentów z PAD. Badania dotyczące stężeń fibrynogenu, CRP, IL-6 i IL-10 u pacjentów z PAD potwierdzają wcześniejsze spostrzeżenia innych autorów uznające pomiar stężenia CRP za wskazany także u chorych po rewaskularyzacji w celu oceny wczesnych i późnych powikłań zakrzepowych i restenoz w implantowanych wcześniej stentach.

## Wnioski

1. U pacjentów z PAD po wewnątrznacyniowej rewaskularyzacji stężenie CRP i fibrynogenu podczas rocznej obserwacji wyraźnie się zwiększyło.
2. U tych pacjentów obserwowano istotną korelację między prozapalnym CRP i przeciwzapalną IL-10.
3. Stężenie CRP, fibrynogenu i cytokin: IL-6, bFGF, TGF- $\beta$ 1 i IL-10 zwiększało się także po powstaniu restenoz u pacjentów z PAD, potwierdzając udział w tym procesie miernie nasilonego zapalenia.

## Conclusions

1. In PAD patients after endovascular revascularization the level of CRP and fibrinogen during one-year observation significantly increased.
2. In these patients significant correlation between pro-inflammatory CRP and anti-inflammatory IL-10 was observed.
3. The concentrations of CRP, fibrinogen and cytokines (IL-6, bFGF, TGF- $\beta$ 1 and IL-10) were also higher in PAD-patients with restenosis indicating the involvement of low-grade inflammation in this process.

*This publication is part of project „Wrovasc — Integrated Cardiovascular Centre”, co-financed by the European Regional Development Fund, within Innovative Economy Operational Programme, 2007–2013 realized in Regional Specialist Hospital, Research and Development Centre in Wrocław.*

## References

1. Petersen S, Peto V, Rayner M, Leal J, Luengo-Fernandez R, Gray (2005) A European Cardiovascular disease statistics. London, British Heart Foundation.
2. Brevetti G, Giugliano G, Brevetti L, Hiatt WR (2010) Inflammation in peripheral artery disease. *Circulation*; 122: 1862–1875.
3. Libby P, Ridker PM, Maseri A (2002) Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*; 105: 1135–1143.
4. Ross R (1993) The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*; 362: 801–809.
5. Nijm J, Wikby A, Tompa A, Olsson AG, Jonasson L (2005) Circulating levels of proinflammatory cytokines and neutrophil-platelet aggregates in patients with coronary artery disease. *Am J Cardiol*; 95: 452–456.
6. Makin A, Silverman SH, Lip GY (2002) Peripheral vascular disease and Virchow's triad for thrombogenesis. *QJM*; 95: 199–210.
7. Speiser W, Speiser P, Minar E et al (1990) Activation of coagulation and fibrinolysis in patients with arteriosclerosis: relation to localization of vessel disease and risk factors. *Thromb Res*; 1; 59: 77–88.
8. Strano A, Hoppensteadt D, Walenga JM et al (1996) Plasma levels of the molecular markers of coagulation and fibrinolysis in patients with peripheral arterial disease. *Semin Thromb Hemost*; 22 Suppl 1: 35–40.
9. Joseph L, Fink LM, Hauer-Jensen M (2002) Cytokines in coagulation and thrombosis: a preclinical and clinical review. *Blood Coagul Fibrinolysis*; 13: 105–116.
10. Pinderski Oslund LJ, Hedrick CC, Olvera T et al (1999) Interleukin-10 blocks atherosclerotic events in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 19: 2847–2853.
11. Gimeno MJ, Pascual G, García-Honduvilla N et al (2003) Modulatory role of IL10 in endothelial cell damage and platelet adhesion. *Histol Histopathol*; 18: 695–702.
12. Smith FB, Lee AJ, Hau CM, Rumley A, Lowe GD, Fowkes FG (2000) Plasma fibrinogen, haemostatic factors and

*Publikacja jest częścią projektu „Wrovasc — Zintegrowane Centrum Medycyny Sercowo-Naczyniowej” współfinansowanego przez Europejski Fundusz Rozwoju Regionalnego, w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka na lata 2007–2013 realizowanego w Ośrodku Badawczo-Rozwojowym Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego we Wrocławiu.*

- 
- prediction of peripheral arterial disease in the Edinburgh Artery Study. *Blood Coagul Fibrinolysis*; 11: 43–50.
13. Raines EW, Bowen-Pope DF, Ross R (1990) Handbook of Experimental Pharmacology. Peptide Growth Factors and Their Receptors. edited by MB Sporn, AB Roberts, Heidelberg, Springer-Berlin.
  14. Montagnana M, Fava C, Arosio E et al (2007) Inflammation and platelet activation in peripheral arterial occlusive disease. *Int J Angiol*; 16: 84–88.
  15. Iwashima Y, Horio T, Suzuki Y et al (2006) Adiponectin and inflammatory markers in peripheral arterial occlusive disease. *Atherosclerosis*; 188, 384–390.
  16. Schillinger M, Exner M, Mlekusch W et al (2002) Balloon angioplasty and stent implantation induce a vascular inflammatory reaction. *J Endovasc Ther*; 9: 59–66.
  17. Schillinger M, Exner M, Mlekusch W et al (2002) Vascular inflammation and percutaneous transluminal angioplasty of the femoropopliteal artery: association with restenosis. *Radiology*; 225: 21–26.
  18. Gabrusewicz A, Słowiński P, Krosny T, Staszkiwicz W (2012) The present state of the art of the pathophysiology, diagnosis and treatment of the superficial femoral artery occlusion based on own results. *Post N Med*; 25: 612–616.
  19. Vainas T, Stassen FR, de Graaf R et al (2005) C-reactive protein in peripheral arterial disease: relation to severity of the disease and to future cardiovascular events. *J Vasc Surg*; 42: 243–251.
  20. Van Der Meer IM, De Maat MP, Hak AE et al (2002) C-reactive protein predicts progression of atherosclerosis measured at various sites in the arterial tree: the Rotterdam Study. *Stroke*; 33: 2750–2755.
  21. Tschopl M, Tsakiris DA, Marbet GA, Labs KH, Jäger K (1997) Role of hemostatic risk factors for restenosis in peripheral arterial occlusive disease after transluminal angioplasty. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 17: 3208–3214.
  22. Cassar K, Bachoo P, Ford I, Greaves M, Brittenden J (2005) Markers of coagulation activation, endothelial stimulation and inflammation in patients with peripheral arterial disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg*; 29: 171–176.
  23. Kornowski R, Hong MK, Tio FO et al (1998) In-stent restenosis: contributions of inflammatory responses and arterial injury to neointimal hyperplasia. *J Am Coll Cardiol*; 31: 224–230.
  24. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH (1998) Plasma concentration of C-reactive protein and risk of developing peripheral vascular disease. *Circulation*; 97: 425–428.

25. Schillinger M, Exner M, Mlekusch W et al (2003) Endovascular revascularization below the knee: 6-month results and predictive value of C-reactive protein level. *Radiology*; 227: 419–425.
26. Seo JW, Kim HK, Lee DS, Cho HI (2007) Clinical usefulness of plasma interleukin-6 and interleukin-10 in disseminated intravascular coagulation. *Korean J Lab Med*; 27: 83–88.
27. Taniguchi Y, Yorioka N, Yamashita K, Masaki T, Yamakido M (1999) Transforming growth factor-beta1 may be involved in shunt obstruction in patients on chronic hemodialysis. *Nephron*; 81: 102–105.
28. Brevetti G, Schiano V, Laurenzano E et al (2008) Myeloperoxidase, but not C-reactive protein, predicts cardiovascular risk in peripheral arterial disease. *Eur Heart J*; 29: 224–230.
29. Buffon A, Liuzzo G, Biasucci LM et al (1999) Preprocedural serum levels of C-reactive protein predict early complications and late restenosis after coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol*; 34: 1512–1521.
30. Ariyoshi H, Okuyama M, Okahara K et al (1997) Expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE) vascular graft loses its thrombogenicity six months after implantation. *Thromb Res*; 88: 427–433.
31. Camilleri JP, Phat VN, Bruneval P et al (1985) Surface healing and histologic maturation of patent polytetrafluoroethylene grafts implanted in patients for up to 60 months. *Arch Pathol Lab Med*; 109: 833–837.